บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาการแสดงออกของ p53 และการปรากฏของ CK และ PCNA ในเนื้องอกอะมีโลบลาสโทมาที่มีการเรียงตัวแบบฟอลลิคูลาร์ แบบเพลกซิฟอร์ม และแบบผสมของฟอลลิคูลาร์ และเพลกซิฟอร์ม ในห้องปฏิบัติการครั้งนี้ เป็นการศึกษาเชิงทดลอง ซึ่งประกอบด้วยการทดลอง 3 ขั้นตอนดังนี้

1. สืบค้นตัวอย่างเนื้องอกที่ใช้ในการศึกษา และแยกชนิดตามลักษณะการเรียงตัวของเซลล์เนื้องอกเป็น 3 แบบ คือ แบบฟอลลิคูลาร์ แบบเพลกซิฟอร์ม และแบบผสมของฟอลลิคูลาร์และเพลกซิฟอร์ม โดยไม่เลือกแบบที่มีการผันแปรทางลักษณะจุลพยาธิวิทยา

2. เตรียมตัวอย่างและย้อมด้วยแอนติบอดี 3 ชนิดคือ แอนติบอดีต่อ P53, CK และ PCNA

3. ศึกษาผลการติดสีของเซลล์เนื้องอกที่เกิดจากทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเนื้องอกได้มาจากเนื้อเยื่อในพาราฟินบล็อคของภาควิชาทันตพยาธิวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้รับการตรวจและพิเคราะห์โรคแล้วว่าเป็นเนื้องอกอะมีโลบลาสโทมาที่มีการเรียงตัวแบบฟอลลิคูลาร์ แบบเพลกซิฟอร์มและแบบผสมของฟอลลิคูลาร์และเพลกซิฟอร์มชนิดละ 10 ตัวอย่างรวมจำนวน 30 ตัวอย่าง

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. หมวดสารเคมีทั่วไป

- Absolute alcohol
- Methyl alcohol
- Hydrogen peroxide 30%
- Acetone

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 0.01M Sodium citrate pH6.0 (วิธีเตรียมน้ำยาดูที่ภาคผนวก)
- TBS (วิธีเตรียมน้ำยาดูที่ภาคผนวก)
- Calcium chloride
- Light green stain
- Hematoxyllin stain
- Xylene
- Scott tap water
- Acid alcohol

2. หมวดสารเคมีเฉพาะสำหรับวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

- Bovine serum albumin (BSA;Sigma, USA)
- Mouse anti-human CK antibody (DAKO, USA)
- Mouse anti-human PCNA antibody (DAKO, USA)
- Mouse anti-human P53 antibody (SIGMA, USA)
- Goat anti-rabbit secondary antibody (DAKO, USA)
- Goat anti-mouse secondary antibody (DAKO, USA)
- Antigen retrieval solution (DAKO, USA)
- 3-Aminopropyl triethoxylane (Sigma, USA)
- DAB (3-3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride)(Sigma,USA)

3.หมวดวัสดุอุปกรณ์

- Glass slide and cover slip

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- อุปกรณ์เบ็ดเตล็ดเช่น ปิเปต ถุงมือ เทปติดฉลาก กระดาษซับ Coplin jar และอื่นๆ

- Moist chamber

- ตู้เย็นรักษาอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- เครื่องดูดควันและสารเคมี (ERLA series 4000, USA)

- กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงขาว (Olympus BH-2, Japan)

- เครื่องชั่งน้ำหนัก (Metler Toledo, Switzerland)

- ตู้อบระบบไมโครเวฟ (microwave oven)

- Microtome

- เครื่องอบสไลด์

- อุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับการย้อมสไลด์

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สืบค้นตัวอย่างเนื้อเยื่อจากใบประวัติผลการตรวจชิ้นเนื้อ (biopsy report) ที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่า เป็นเนื้องอกอะมีโลบลาสโทมาที่มีการเรียงตัวแบบฟอลลิคูลาร์ แบบเพลกซิฟอร์ม และแบบผสมของฟอลลิคูลาร์และเพลกซิฟอร์ม โดยไม่เลือกแบบที่มีการผันแปรทางลักษณะจุลพยาธิวิทยา โดยตัวอย่างเนื้องอกที่นำมาศึกษาทั้งหมดไม่มีการจำแนกตามเพศ อายุ หรือการเกิดครั้งแรก (primary case) และการเกิดซ้ำ (recurrent case) โดยเนื้องอกเหล่านี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้องอกร้ายแรง หรือมีประวัติแพร่กระจายไปอวัยวะอื่น กลุ่มควบคุมใช้เนื้องอกไฟโบรมาสำหรับแอนติบอดีต่อ CK โดยเลือกที่มีเอ็พพิทีเลียมปกติให้พบได้ และเนื้องอกสความัสเซลล์คาร์ซิโนมาเป็นกลุ่มควบคุมสำหรับแอนติบอดีที่เฉพาะต่อ PCNA และ P53 เนื่องจากมีเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวให้พบได้มาก

2. เมื่อได้ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่อยู่ในบล็อคพาราฟินเรียบร้อยแล้ว นำมาตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัด microtome ในห้องปฏิบัติการตรวจสอบชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา โดยตัดที่ความหนา 5 ไมครอน และนำมาติดบนสไลด์แก้วที่สะอาดและได้รับการเคลือบสารยึดติดเนื้อเยื่อ (adhesive)

ซึ่งได้เตรียมไว้ล่วงหน้าแล้ว (ในหัวข้อการเตรียมสไลด์แก้วเพื่อใช้ในวิธีการอิมมูโนฮิสโตเคมี; ภาคผนวก)

3. ย้อมตัวอย่างเนื้องอกที่ได้ตัดและวางบนแผ่นสไลด์แก้วแล้วด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี การย้อมสไลด์ประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 จัดแบ่งสไลด์แก้วออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลอง ซึ่งจะถูกทำปฏิกริยากับแอนติบอดีต่อ CK, PCNA และ P53 กลุ่มควบคุมผลบวก และกลุ่มควบคุมผลลบ

3.2 กำจัดพาราฟินและแทนที่น้ำในชิ้นเนื้อบนแผ่นสไลด์ด้วย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที และ absolute alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด

3.3 นำสไลด์มาแช่ลงใน 2 % methanol peroxide เพื่อกำจัด endogenous peroxidase เป็นเวลา 10 นาที

3.4 ล้างด้วยน้ำสะอาด และปล่อยให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 5 นาที

3.5 ทำการเผยตำแหน่งการจดจำของแอนติบอดีบนสายโปรทีน (antigen retrieval) ด้วยการใช้ตู้อบระบบไมโครเวฟให้ความร้อน โดยนำสไลด์แก้ว มาใส่ใน Coplin jar ที่ภายในบรรจุด้วย 0.01 M Sodium citrate buffer (pH 6.0) โดยแอนติบอดีแต่ละชนิดจะใช้ความร้อน และเวลาต่างกันคือ

แอนติบอดีต่อ CK ใช้พลังงานที่ระดับ 700 watts โดยมีลำดับเวลาดังนี้คือให้ความร้อนเป็นเวลา 60 วินาที เมื่อครบกำหนดตั้งทิ้งไว้ในตู้อบระบบไมโครเวฟนาน 4 นาที และให้ความร้อนอีก 40 วินาที เมื่อครบกำหนดตั้งทิ้งไว้ในตู้อบระบบไมโครเวฟนาน 2 นาทีและให้ความร้อนอีก 40 วินาที

แอนติบอดีต่อ PCNA ใช้พลังงานที่ระดับ 700 watts โดยมีลำดับเวลาดังนี้คือให้ความร้อนเป็นเวลา 60 วินาที เมื่อครบกำหนดตั้งทิ้งไว้ในตู้อบระบบไมโครเวฟนาน 3 นาที และให้ความร้อนอีก 20 วินาที เมื่อครบกำหนดตั้งทิ้งไว้ในตู้อบระบบไมโครเวฟนาน 1 นาทีและให้ความร้อนอีก 20 วินาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอนติบอดีต่อ P53 จะใช้พลังงานที่ระดับ 900 watts โดยให้ความร้อนเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาจึงลดระดับพลังงานลงมาที่ระดับ400 watts ให้ความร้อนอีก 5 นาที

หลังจากทำการเผยตำแหน่งการจดจำของแอนติบอดีแต่ละชนิดแล้วนำสไลด์ที่อยู่ใน Coplin jar ออกจากตู้อบระบบไมโครเวฟทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำสไลด์ทั้งหมดมาผ่านน้ำและล้างเป็นเวลา 5 นาที

3.6 นำสไลด์แก้วมาแช่และล้างใน TBS เป็นเวลา 5 นาที

3.7 ใส่ 1% BSA ในTBS เพื่อ block nonspecific reaction ทิ้งไว้นาน 5 นาที

3.8 ใส่ primary antibody ซึ่งในการศึกษานี้ใช้แอนติบอดีต่อ CK, PCNA และ P53 จากนั้น เก็บไว้ใน moist chamber เป็นเวลา 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (สำหรับ P53 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 12 ชั่วโมง) สำหรับกลุ่มควบคุมผลลบทำการทดลองในลักษณะเดียวกัน โดย primary antibody จะถูกแทนที่ด้วย TBS

3.9 จากนั้นนำมาล้างด้วย TBS 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที

3.10 นำมาใส่ด้วย secondary antibody ที่เหมาะสมกับชนิดของ primary antibody โดยชนิดของ secondary antibody นี้จะเป็นชนิดที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ peroxidase เก็บไว้ใน moist chamber นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.11 ล้างด้วย TBS 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

3.12 ใส่ DAB ที่เตรียมไว้ (ในหัวข้อการเตรียมน้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย; ภาคผนวก) ให้ทำปฏิกริยากับชิ้นเนื้อตัวอย่างเป็นเวลา 10 นาที

3.13 ล้างสไลด์ ด้วยน้ำสะอาดเป็นเวลา 5 นาที

3.14 นำมาย้อมทับ (counter stain) ด้วยสีฮีมาทอกไซลิน หรือไลท์กรีน

3.15 นำสไลด์ที่ผ่านการทำปฏิกริยาแล้วไปทำการดึงน้ำออกจากตัวอย่างเนื้องอกบนสไลด์แก้วด้วยการแช่ลงใน alcohol และ xylene

3.16 ปิดด้วย cover slip

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.17 อ่านผลและบันทึกข้อมูล ด้วยการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงขาวใช้ฟิล์มสี Kodak ASA 100

3.18 ทำการศึกษาซ้ำ 3 ครั้ง สำหรับแอนติบอดีแต่ละชนิด ในเนื้องอกที่มีการเรียงตัวทั้ง 3 แบบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

เนื่องจากงานวิจัยในครั้งนี้ ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ จึงไม่มีการนำมาเปรียบเทียบด้วยวิธีการทางสถิติ สามารถแสดงผลการวิจัยและสรุปผลไปในทางบรรยายโวหาร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย